

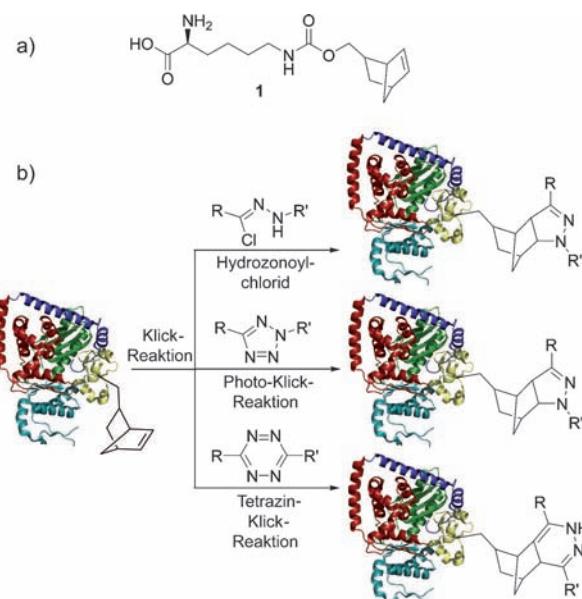
Genetische Kodierung einer Norbornen-Aminosäure zur milden und selektiven Modifikation von Proteinen mit einer kupferfreien Klick-Reaktion**

Emine Kaya, Milan Vrabel, Christian Deiml, Stefan Prill, Viviana S. Fluxa und Thomas Carell*

Methoden zur selektiven Modifikation von Proteinen sind gegenwärtig von immenser Bedeutung, da sie für die Synthese von Proteinhybriden für pharmazeutische und diagnostische Zwecke benötigt werden.^[1] Die meisten beruhen derzeit auf der Reaktion von Maleimiden mit freien Thiolen an der Proteinoberfläche^[2] oder auf der Reaktion von Lysinresten mit Aktivestern.^[3] Jedoch sind diese Methoden nur begrenzt spezifisch, was Forschern als Motivation zur Entwicklung alternativer Strategien dient. Der Einbau von speziellen nichtnatürlichen Aminosäuren bietet eine ausgezeichnete Möglichkeiten für die spezifische bioorthogonale Funktionalisierung von Proteinen.^[4] Die am besten untersuchte Technologie stellt hierbei die Cu¹-katalysierte Reaktion eines Proteins mit eingebauter Alkin-Aminosäure mit einem Azid dar.^[5,6] Die Notwendigkeit von Cu¹-Salzen, welche die Proteinstruktur schädigen können, schränkt jedoch deren Anwendbarkeit ein.^[7] Dies gibt Ansporn, kupferfreie Reaktionen zu entwickeln, welche sich auch auf empfindliche Proteine anwenden lassen.^[8] Hier zeigen wir, dass diesen Ansprüchen durch die Verwendung einer speziell kodierten Norbornen-Aminosäure, die selektiv mit Nitriliminen reagiert, entsprochen werden kann.

Mithilfe der Amber-Suppressions-Technologie, welche auf dem Pyrrolysyl-tRNA/Pyrrolysyl-tRNA-Synthetase-Paar (tRNA^{PyL}/PylRS) aus *Methanosarcina mazei* beruht, können wir eine Norbornen-Aminosäure in ein Protein einbauen.^[9] Die Hauptarbeit des Projekts stellte die Evolvierung der Pyrrolysin-Synthetase dar, sodass sie die synthetische Norbornen-Aminosäure **1** akzeptiert (Schema 1a) und auf die Pyrrolysyl-tRNA überträgt.

Ausgehend von kommerziell erhältlichen Ausgangsstoffen synthetisierten wir in sieben Stufen das Pyl-Analog **1** mit Norbornen-Rest (siehe die Hintergrundinformationen). Um



Schema 1. a) Strukturformel des Norbornen-Pyl-Analogs **1**. b) Schematische Darstellung der Klick-Reaktionen. Oberen: Das ausgehend vom Hydrazonylchlorid durch basekatalysierte HCl-Eliminierung erzeugte Nitrilimin addiert an das Norbornen. Mitte: Alternativ wird das Nitrilimin aus Tetrazol durch eine photochemische Reaktion erzeugt. Unten: Norbornen reagiert auch mit Tetrazinen in einer Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf. (Die Proteinabbildungen wurden mithilfe von PDB 3IN5 erstellt.)

die Effizienz des Einbaus von **1** durch die Wildtyp-PylRS zu erforschen, verwendeten wir mit Plasmiden transfizierte *E. coli*-Zellen, die sowohl für das tRNA^{PyL}/PylRS-Paar als auch für ein mit einem internem TAG-Stoppcodon modifiziertes Gelb fluoreszierendes Protein (YFP) kodieren.^[10] In diesem System kann das YFP nur in voller Länge und damit fluoreszierend exprimiert werden, wenn das zugehörige Pyl-Analog von der PylRS akzeptiert und so auf die tRNA^{PyL} geladen wird. Dieses System ermöglicht den Einbau von **1** in das Protein an der Stelle des Amber-Stoppcodons.

Die so präparierten *E. coli*-Zellen wuchsen in einem Medium mit 5 mM von **1**. Zusätzlich zum Wildtyp-PylRS wurde eine von Yanagisawa und Mitarbeitern erzeugte PylRS-Mutante getestet.^[4f] Die ersten Experimente für die Wildtyp-PylRS zeigten keine Fluoreszenz. Auch mit der PylRS-(Y384F)-Mutante wurde nur geringfügige Fluoreszenz beobachtet, woraus geschlossen werden kann, dass YFP nicht in voller Länge erzeugt wurde. Um die Aktivität der PylRS zu erhöhen, optimierten wir das Protein durch iterative Sätti-

[*] Dipl.-Ing. E. Kaya, [+] Dr. M. Vrabel, [+] M. Sc. C. Deiml, M. Sc. S. Prill, Dr. V. S. Fluxa, Prof. Dr. T. Carell
Department Chemie, Ludwig-Maximilians-Universität
Butenandtstraße 5–13, 81377 München (Deutschland)
E-Mail: thomas.carell@cup.uni-muenchen.de
Homepage: <http://www.carellgroup.de>

[†] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.

[**] Wir danken Prof. Dr. Manfred T. Reetz und Dr. Despina Bougioukou für ihre Hilfe bei der Mutagenese. Wir danken der Bayer Pharma AG, dem Exzellenzcluster CiPS^M und der Volkswagen Foundation für ihre großzügige Unterstützung. M.V. dankt der LMU München für sein Postdoktorandenstipendium. V.S.F. dankt der SNSF für ihr Postdoktorandenstipendium.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201109252> zu finden.

gungsmutagenese (ISM), ein von Reetz und Mitarbeitern entwickeltes Verfahren.^[11]

Basierend auf der Cokristallstruktur von PylRS und adenyliertem Pyrolysin (PDB 2Q7H) haben wir fünf Reste in der substratbindenden Tasche der wt-PylRS für die Evolierung ausgewählt. Nach der Transformation der plasmidbasierten PylRS-Bibliothek in *E. coli* wurden einzelne Kolonien in einer Flüssigkultur in Gegenwart von **1** gezüchtet. Der Einbau wurde mit YFP-Fluoreszenzmessungen in den Zellen verfolgt. Die effizienteste PylRS-Variante wurde sequenziert und in der nächsten Runde der Sättigungsmutagenese verwendet. Durch dreimalige Wiederholung konnte eine gesättigte Mutagenese aller fünf Positionen sichergestellt werden. Die Sättigungsmutagenese ergab ein norb-PylRS-Enzym mit folgenden Mutationen: Tyr384Phe, Tyr306Gly und Ile405Arg. Dieses Protein baute die Aminosäure **1** um den Faktor vier effizienter ein als die Tyr384Phe-Mutante.

Um herauszufinden, ob Norbornen an der Proteinoberfläche selektiv funktionalisiert werden kann, wurden zwei Plasmide in *E. coli*-Zellen eingebracht. Ein Plasmid kodiert für drei Kopien der *M. mazei*-tRNA^{Pyl} und eine Kopie der norb-PylRS. Das zweite Plasmid kodiert für eine verkürzte humane Polymerase κ (*hPolκ*) mit C-terminaler His₆-Markierung und einem Amber-Codon an Position 163. Als wichtiges und fragiles Mitglied der humanen Polymerasen mit hoher Schadenstoleranz stellt *hPolκ* ein optimales Protein für die Experimente dar.^[12] Modifikationsmethoden für dieses Protein sind für die Untersuchung der Dynamik in der DNA-Reparatur höchst wünschenswert. Die entsprechenden *E. coli*-Zellen wuchsen in Standardmedium mit 2 mM **1**. Aus 1 L Zellkultur wurden nach drei Aufreinigungsschritten (Ni-NTA-Affinitätschromatographie, Heparin-Affinitätschromatographie und Superdex-200-Gelfiltration) 2 mg der *hPolκ* mit Norbornen (norb-*hPolκ*) isoliert. Der Nachweis des spezifischen Einbaus der Norbornen-Aminosäure an Position 163 von *hPolκ* konnte mithilfe von hochauflösender Massenspektrometrie geliefert werden (siehe die Hintergrundinformationen). Im Massenspektrum konnte kein Peptidfragment mit Lysin an dieser Position (als Folge einer Hydrolyse des Carbamats) detektiert werden, was für den vollständigen Einbau der Norbornen-Aminosäure spricht.

Wir haben für die folgenden Funktionalisierungen diverse Cycloadditionen getestet, unter anderem Reaktionen mit Nitriloxiden;^[13] jedoch wurde hier in allen Fällen auch eine Reaktion mit dem Protein selbst beobachtet. Erfolgreicher waren Experimente mit Nitriliminen. Diese schwachen Elektrophile reagieren effizient mit gespannten Doppelbindungen. Um diese Reaktion genauer zu studieren, stellten wir das Hydrazonoylchlorid **2** her und erzeugten das entsprechende Nitrilimin durch basekatalysierte HCl-Eliminierung, wie es in Lit. [14] von Huisgen bereits beschrieben wurde. Wie wir herausfanden, ist die Eliminierung von HCl schon in wässrigen Puffersystemen bei für Proteine optimalem pH-Wert von 7.4 möglich. Die photochemische Reaktion von Tetrazolen stellt eine weitere Möglichkeit dar, Nitrilimine zu erzeugen, wie es von Lin und Mitarbeitern bereits gezeigt wurde.^[8h, 15] Um die Reaktion weiter zu studieren, haben wir auch das Tetrazol **3** synthetisiert. Als Alternative zu Umsetzungen mit Nitriliminen stellt das synthetisierte Tetrazin **4**,

das in einer Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf mit Norbornen reagiert, eine letzte zu untersuchende Möglichkeit dar.^[8d,e] Für die Funktionalisierung von Proteinen haben wir jeweils die Reagenzien **2**, **3** und **4** zu einer Lösung von norb-*hPolκ* in 10 mM Tris-HCl-Puffer mit pH 7.4 für 1 h bei Raumtemperatur gegeben. Die Kontrollexperimente wurden mit Wildtyp-*hPolκ* durchgeführt. Im Fall des Tetrazols **3** wurde die Reaktionsmischung 10 min mit UV-Licht ($\lambda = 302$ nm) bestrahlt, um das Nitrilimin zu erzeugen (siehe Schema 1). Diese Bedingungen wurden von Lin und Mitarbeiter für die Funktionalisierung von Lysozym, das auf Basis von Maleimid mit Norbornen modifiziert wurde, optimiert.^[8g] Die Fluoreszenzanalyse mit SDS-PAGE zeigt klar, dass alle Funktionalisierungen erfolgreich waren (Abbildung 1; Spalte 2, 4 und 6) und keine Reaktion mit Wildtyp-*hPolκ* erfolgte (Abbildung 1; Spalte 1, 3 und 5). Dies gereicht als Beweis für die Spezifität der Reaktionen.

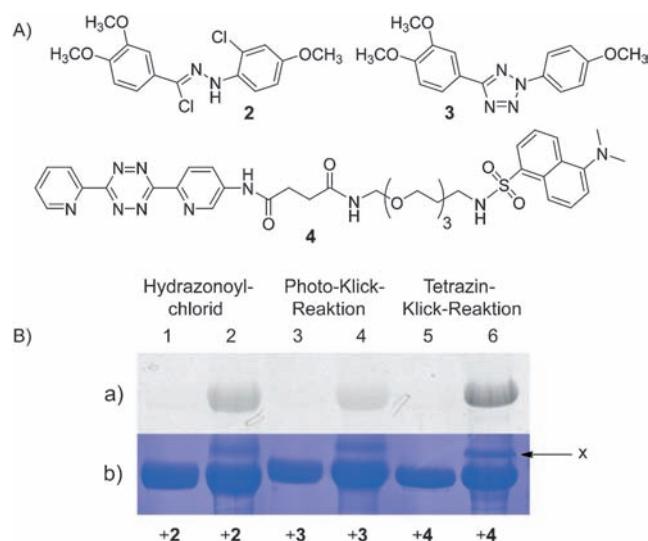


Abbildung 1. A) Strukturformeln der Verbindungen **2–4**. B) SDS-PAGE von *hPolκ* mit eingebautem Norbornen zur Fluoreszenzmarkierung mit **2–4**: a) Das Gel zeigt die fluoreszierenden Klick-Produkte; b) Coomassie-Färbung desselben Gels: Die Spalten 1, 3 und 5 zeigen die Kontrollexperimente mit Wildtyp-*hPolκ*, die Spalten 2, 4 und 6 zeigen die Reaktionen mit *hPolκ* mit eingebautem Norbornen. X = Proteinverunreinigung.

Die exakte Position der chemischen Modifikation wurde durch hochauflösende HPLC-ESI-MS-Analyse (siehe Abbildung 2 und die Hintergrundinformationen) nach tryptischen Verdau des funktionalisierten *hPolκ* verifiziert. Die erwarteten Peptide für *hPolκ* wurden im Massenspektrum mit exzellenter Sequenzabdeckung von 80% nachgewiesen. Weiter konnten wir das mit Hydrazonoylchlorid modifizierte Peptid (LCP^{X¹}IIVPPNF^{D²}K, mit ^{X¹} als modifizierte Norbornen-Aminosäure) nachweisen. Die gemessene Masse dieses Peptids (*m/z* 2031.10) ist in guter Übereinstimmung mit der berechneten Peptidmasse (2031.06). Dieses Peptid wurde im Massenspektrometer (MS-Sequenzierung) weiter fragmentiert, um die entscheidenden b- und y-Ionen zu

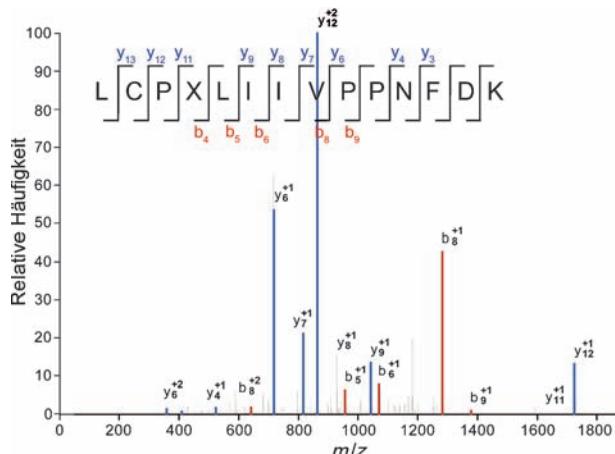


Abbildung 2. MS/MS-Spektrum des tryptischen Verdaus des Peptids LCPXLIIVPPNFDK der modifizierten *hPolk* nach Klick-Reaktion mit Hydrazonoylchlorid **2** (X¹ ist die Position des mit Hydrazonoylchlorid modifizierten Norbornens).

identifizieren (Abbildung 2). Die detektierten Ionen beweisen, dass die Funktionalisierung nur an der gewünschten Position stattfindet.

Die Ausbeute der Funktionalisierung konnte anhand der Reaktion der Norbornen-Aminosäure **1** mit dem zuvor aus **2** erzeugten Nitrilimin bestimmt werden. Hierfür haben wir zuerst die Fluoreszenz der erhaltenen Klick-Produkte bei verschiedenen Konzentrationen gemessen, um die Kalibrierungsgerade zu erhalten (siehe die Hintergrundinformationen). Weiter haben wir das Decapeptid AFDXKDKPAA mit der Norbornen-Aminosäure **1** an Position **X** synthetisiert. Dieses Peptid wurde in verschiedenen Molverhältnissen mit dem aus **2** erzeugten Nitrilimin umgesetzt. Durch den Vergleich mit der zuvor erstellten Kalibrierungsgerade konnte eine quantitative Umsetzung des Peptids bei der Reaktion mit 10 Äquiv. von **2** für 2 h und Raumtemperatur bestimmt werden. Auch eine MALDI-ToF-Analyse zeigte keine Reste von nicht umgesetztem Peptid nach vollendeter Reaktion (siehe die Hintergrundinformationen).

Für die Quantifizierung der Effizienz der Klick-Reaktion am Protein wurden 240 pmol norb-*hPolk* mit zunehmender Stoffmenge des aus **2** erzeugten Nitrilimins umgesetzt (Abbildung 3). Unter Zuhilfenahme der Kalibrierungsgerade konnte eine Ausbeute von 98% bei Umsetzung mit 100 Äquiv. **2** bestimmt werden. Diese vollständige Umsetzung wird schon nach 1 h bei Raumtemperatur erhalten. Zuletzt konnten wir belegen, dass die empfindliche *hPolk* nach der Reaktion mit dem Nitrilimin weiterhin aktiv ist. Hierfür verglichen wir die durch Klick-Reaktion modifizierte *hPolk* mit der Wildtyp-*hPolk* in einem Primerextensions-Aktivitätstest. In den Reaktionen mit dem nicht photochemisch erzeugten Nitrilimin und der Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf bleibt das Protein vollständig aktiv (Abbildung S4 in den Hintergrundinformationen). Nur das Protein nach der photoinduzierten Klick-Reaktion zeigt verminderte Aktivität, da das benötigte UV-Licht mit einer Wellenlänge von 320 nm dem Protein schadet.^[16]

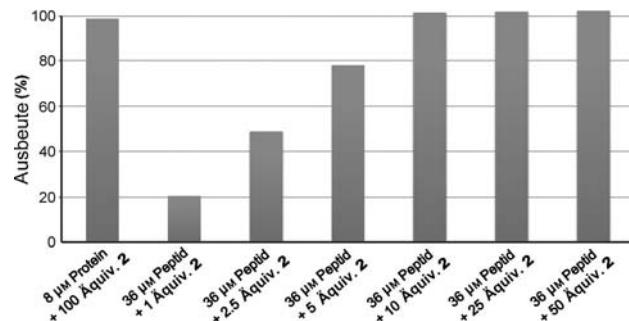


Abbildung 3. Quantifizierung der Effizienz der Klick-Reaktion basierend auf der Fluoreszenzemission des Klick-Produkts. Nor-Polk wurde mit 100 Äquiv. und das Peptid AFDXKDKPAA mit 1, 2, 5, 10, 25 und 50 Äquiv. des aus **2** erzeugten Nitrilimins umgesetzt.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass die Erzeugung des Nitrilimins durch HCl-Eliminierung und die anschließende Reaktion mit einem Protein, das eine Norbornen-Aminosäure enthält, unter milden Bedingungen (pH 7.4) ein vollständig aktives, modifiziertes Protein ergibt und dass die Klick-Reaktion mit dem zu modifizierenden Protein binnen 1 h bei Raumtemperatur fast quantitativ erfolgt. Die Fähigkeit, eine Norbornen-Aminosäure mithilfe des Pyrrolysin-Systems und der speziell evolvierten Synthetase in Proteine einzubauen, ermöglicht die verlässliche und effiziente chemische Modifikation auch von empfindlichen Proteinen.^[17]

Eingegangen am 30. Dezember 2011
Online veröffentlicht am 21. März 2012

Stichwörter: Kupferfreie Klick-Chemie · Nitrilimin · Norbornen-Aminosäure · Proteinmodifikation · Pyrrolysin

- [1] a) J. Kalia, R. T. Raines, *Curr. Org. Chem.* **2010**, *14*, 138–147; b) R. K. Lim, Q. Lin, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 1589–1600; c) C. C. Liu, P. G. Schultz, *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, *79*, 413–444.
- [2] J. M. Chalker, G. J. Bernardes, Y. A. Lin, B. G. Davis, *Chem. Asian J.* **2009**, *4*, 630–640.
- [3] M. Morpurgo, E. A. Bayer, M. Wilchek, *J. Biochem. Biophys. Methods* **1999**, *38*, 17–28.
- [4] a) T. Fekner, X. Li, M. M. Lee, M. K. Chan, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 1661–1663; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1633–1635; b) Z. Hao, Y. Song, S. Lin, M. Yang, Y. Liang, J. Wang, P. R. Chen, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 4502–4504; c) D. P. Nguyen, H. Lusic, H. Neumann, P. B. Kapadnis, A. Deiters, J. W. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 8720–8721; d) T. Plass, S. Milles, C. Koehler, C. Schultz, E. A. Lemke, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 3964–3967; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 3878–3881; e) L. Wang, Z. Zhang, A. Brock, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 56–61; f) T. Yanagisawa, R. Ishii, R. Fukunaga, T. Kobayashi, K. Sakamoto, S. Yokoyama, *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 1187–1197.
- [5] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2708–2711; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599.
- [6] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064.

- [7] D. Soriano Del Amo, W. Wang, H. Jiang, C. Besanceney, A. C. Yan, M. Levy, Y. Liu, F. L. Marlow, P. Wu, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 16893–16899.
- [8] a) J. C. Jewett, E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3688–3690; b) B. C. Sanders, F. Friscourt, P. A. Ledin, N. E. Mbua, S. Arumugam, J. Guo, T. J. Boltje, V. V. Popik, G. J. Boons, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 949–957; c) S. S. van Berkel, A. T. Dirks, M. F. Debets, F. L. van Delft, J. J. Cornelissen, R. J. Nolte, F. P. Rutjes, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1504–1508; d) M. L. Blackman, M. Royzen, J. M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13518–13519; e) N. K. Devaraj, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 2297–2299; f) J. Wang, W. Zhang, W. Song, Y. Wang, Z. Yu, J. Li, M. Wu, L. Wang, J. Zang, Q. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14812–14818; g) Z. Yu, R. K. Lim, Q. Lin, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 13325–13329; h) W. Song, Y. Wang, J. Qu, Q. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9654–9655.
- [9] a) M. Ibba, D. Soll, *Curr. Biol.* **2002**, *12*, 464–466; b) S. M. Hancock, R. Upadhyay, A. Deiters, J. W. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14819–14824; c) C. Polycarpo, A. Ambrogelly, A. Berube, S. M. Winbush, J. A. McCloskey, P. F. Crain, J. L. Wood, D. Soll, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 12450–12454; d) C. R. Polycarpo, S. Herring, A. Berube, J. L. Wood, D. Soll, A. Ambrogelly, *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 6695–6700.
- [10] E. Kaya, K. Gutsmiedl, M. Vrabel, M. Müller, P. Thumbs, T. Carell, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 2858–2861.
- [11] M. T. Reetz, D. Kahakeaw, J. Sanchis, *Mol. Biosyst.* **2009**, *5*, 115–122.
- [12] S. S. Lange, K. Takata, R. D. Wood, *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11*, 96–110.
- [13] a) K. Gutsmiedl, D. Fazio, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 6877–6883; b) K. Gutsmiedl, C. T. Wirges, V. Ehmke, T. Carell, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 2405–2408.
- [14] R. Huisgen, M. Seidel, G. Wallbillich, H. Knupfer, *Tetrahedron* **1962**, *17*, 3–29.
- [15] a) J. S. Clovis, A. Eckell, R. Huisgen, R. Sustmann, *Chem. Ber.* **1967**, *100*, 60–70; b) A. Padwa, S. Nahm, E. Sato, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 1664–1671.
- [16] R. L. Wells, A. Han, *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* **1985**, *47*, 17–21.
- [17] Anmerkung bei der Korrektur: Während der Publikation dieser Arbeit erschien eine ähnliche Untersuchung: K. Lang et al., *Nature Chem.* **2012**, DOI: 10.1038/NCHEM.1250.